

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

61352-058  
Okuda et al.  
November 7, 2003  
McDermott, Will & Emery

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 2 年 9 月 2 0 日

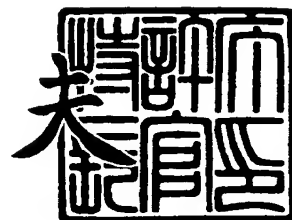
出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 2 7 5 5 9 8  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 2 - 2 7 5 5 9 8 ]

出 願 人  
Applicant(s): 松下電器産業株式会社

2 0 0 3 年 9 月 3 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 8 0 1 9 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 2033840213

【提出日】 平成14年 9月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 H01L 29/00

B01J 2/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区千駄ヶ谷 5 - 2 9 - 7 - 1 0 4

【氏名】 奥田 充宏

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市麻生区片平 1 - 3 - 5

【氏名】 吉村 英恭

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 山下 一郎

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077931

【弁理士】

【氏名又は名称】 前田 弘

【選任した代理人】

【識別番号】 100094134

【弁理士】

【氏名又は名称】 小山 廣毅

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100110939

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 宏

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100110940

【弁理士】

【氏名又は名称】 嶋田 高久

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100113262

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 祐二

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100115059

【弁理士】

【氏名又は名称】 今江 克実

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100115510

【弁理士】

【氏名又は名称】 手島 勝

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100115691

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 篤史

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014409

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0006010

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ナノ粒子、その製造方法およびナノ粒子-タンパク質複合体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 金属イオンの化合物からなるナノ粒子であって、  
炭酸イオンを含む溶液中において、タンパク質の空洞部内に形成されたことを特徴とするナノ粒子。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のナノ粒子において、  
上記金属イオンは、 $\text{Ni}^{2+}$ または $\text{Cr}^{2+}$ のいずれかであることを特徴とするナノ粒子。

【請求項 3】 炭酸イオンを含む第 1 溶液と、金属イオンと、タンパク質と、  
pH 緩衝剤とを含む第 2 溶液とを調製するステップ (a) と、  
上記第 1 溶液と上記第 2 溶液とを混合することによって、上記タンパク質に上記金属イオンの化合物からなるナノ粒子を内包させるステップ (b) と、  
を含むナノ粒子の製造方法。

【請求項 4】 請求項 3 に記載のナノ粒子の製造方法において、  
上記タンパク質は、アポフェリチン、Dps タンパク質、CCMV または TMV のうちのいずれか 1 つであることを特徴とするナノ粒子の製造方法。

【請求項 5】 請求項 3 または 4 に記載のナノ粒子の製造方法において、  
上記ステップ (a) では、上記第 1 溶液中に炭酸ガスを通気することを特徴とするナノ粒子の製造方法。

【請求項 6】 請求項 3 から 5 のいずれか 1 つに記載のナノ粒子の製造方法において、  
上記金属イオンは、 $\text{Ni}^{2+}$ または $\text{Cr}^{2+}$ であることを特徴とするナノ粒子の製造方法。

【請求項 7】 ナノ粒子とタンパク質とから構成されるナノ粒子-タンパク質複合体であって、

上記タンパク質は、上記ナノ粒子を保持可能な保持部と、上記保持部と上記タンパク質の外部とを結ぶチャネルとを備え、

上記ナノ粒子は、 $\text{Ni}^{2+}$ または $\text{Cr}^{2+}$ のいずれかの金属イオンの化合物から形

成されていることを特徴とするナノ粒子-タンパク質複合体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ナノメートルサイズの粒径を有する粒子（本明細書中では、ナノ粒子と称する）に関し、特に、金属または金属化合物からなるナノ粒子を内包するナノ粒子-タンパク質複合体の作製方法、およびその関連技術に関する。

【0002】

【従来の技術】

これまでの機能材料開発の主流は、所望の機能を発現させる新規化合物の探索、合成によって行なわれている。しかしながら、近年は、物質をナノメートルサイズまでに微細化したナノ粒子を作製することで、バルク状態では得られない新機能を発現させることが望まれるようになってきている。特に、近年注目されている量子効果デバイスを作製するために、半導体や金属化合物を中心とする無機材料のナノ粒子を作製することが強く望まれている。

【0003】

従来、ナノ粒子を作製する方法は、物理的粉碎法および化学的合成法などによって行なわれている。例えば、物理的粉碎法は、セラミックスを焼成する際の出発材料を得るために広く用いられている。また、化学的合成法としては、長鎖の有機化合物の間で、塩化金酸を還元することによって金のナノ粒子を作製する方法などがある。ここで、長鎖の有機化合物は、金粒子が成長して巨大化することを阻害している。

【0004】

また、有機化合物とナノ粒子との複合体を作り、化学反応させて均一な粒子を作る方法もある。この応用としては、SAM膜を形成するための材料に金原子を固定し、上記材料を金原子を中心にして集合させることによって、表面にSAM膜が形成された金のナノ粒子を得る方法もある。さらに、ナノ粒子を形成する材料を含むミセルをつくり、ミセル中での化学反応を用いてナノ粒子を作製することも行われている。

**【0005】**

量子効果デバイスを作製するためには、直径が同一のナノ粒子を得ることが不可欠である。ナノ粒子において電子がとり得るエネルギーレベルは、数ナノメートルのオーダーでは、直径に依存して大きく変化する。このため、量子効果を持つナノ粒子を電子回路に応用するためには、直径が一定であることが重要になる。

**【0006】**

しかし、上述の従来の方法では直径が均一なナノ粒子を得ることは難しい。例えば、物理的粉碎法では、そもそも直径をミクロンサイズよりも小さくすることが困難であり、ナノメートルオーダーに近づいたとしても直径を一定にするメカニズムがない。このため、得られるナノ粒子の直径には必然的に大きなバラツキが生じる。また、化学的合成法では、化学反応を利用しているため、これもまた得られるナノ粒子の直径には必然的に大きなバラツキが生じる。また、所要時間、コストの面でも非常に不利である。

**【0007】**

一方、バイオテクノロジーを他分野に応用する試みの1つとして、金属化合物を保持する機能を有するタンパク質であるアポフェリチンに金属または金属化合物を取り込ませ、ナノオーダーの均一なサイズのナノ粒子を作製しようという研究がある。ナノ粒子の用途に応じて種々の金属あるいは金属化合物等をアポフェリチンに導入すべく研究が進められている。

**【0008】**

ここで、アポフェリチンについて説明する。アポフェリチンは、生物界に広く存在するタンパク質であり、生体内では必須微量元素である鉄の量を調節する役割を担っている。鉄または鉄化合物とアポフェリチンとの複合体はフェリチンと呼ばれる。鉄は必要以上に体内に存在すると生体にとって有害であるため、余剰の鉄分はフェリチンの形で体内に貯蔵される。そして、フェリチンは必要に応じて鉄イオンを放出し、アポフェリチンに戻る。

**【0009】**

図1は、アポフェリチンの構造を示す模式図である。図1に示すように、アポ

フェリチン 1 は、1 本のポリペプチド鎖から形成されるモノマーサブユニットが非共有結合により 24 個集合した分子量約 46 万の球状タンパク質であり、その直径は約 12 nm で、通常のタンパク質に比べ高い熱安定性と高い pH 安定性を示す。アポフェリチン 1 の中心には直径約 6 nm の空洞状の保持部 4 があり、外部と保持部 4 とはチャネル 3 を介してつながっている。例えば、アポフェリチン 1 に 2 価の鉄イオンが取り込まれる際、鉄イオンはチャネル 3 から入り、一部のサブユニット内にある *ferrooxidase center* (鉄酸化活性中心) と呼ばれる場所で酸化された後、保持部 4 に到達し、保持部 4 の内表面の負電荷領域で濃縮される。そして、鉄原子は 3000~4000 個集合し、フェリハイドライト ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) 結晶の形で保持部 4 に保持される。保持部 4 に保持された金属原子を含むナノ粒子の直径は、保持部 4 の直径とほぼ等しく、約 6 nm となっている。

#### 【0010】

このアポフェリチンを用いて、人工的に鉄以外の金属や金属化合物を担持させたナノ粒子-アポフェリチン複合体が作製されている。

#### 【0011】

現在までに、マンガン (非特許文献 1 および 2 を参照)、ウラン (非特許文献 3 を参照)、ベリリウム (非特許文献 4 を参照)、アルミニウム (非特許文献 5 を参照)、および亜鉛 (非特許文献 6 を参照) といった金属あるいは金属化合物のアポフェリチンへの導入が報告されている。これらの金属あるいは金属化合物からなるナノ粒子の直径も、アポフェリチンの保持部 4 の直径とほぼ等しく、約 6 nm となる。

#### 【0012】

##### 【非特許文献 1】

P.Mackle、1993年、J. Amer. Chem. Soc. 115、8471-8472ページ

##### 【非特許文献 2】

F.C.Meldrumら、1995年、J. Inorg. Biochem. 58、59-68ページ

##### 【非特許文献 3】

J.F.Hainfeld、1992年、Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89、11064-11068ページ



## 【非特許文献 4】

D.J.Price、1983年、J. Biol. Chem. 258、10873-10880ページ

## 【非特許文献 5】

J.Fleming、1987年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84、7866-7870ページ

## 【非特許文献 6】

D.PriceおよびJ.G.Joshi、1982年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、79、3116-3119ページ

自然界において、鉄原子を含むナノ粒子がアポフェリチン内に形成される過程の概略は次の通りである。

## 【0 0 1 3】

アポフェリチン 1 の外部と内部とを結ぶチャネル 3（図 1 参照）の表面には、pH 7～8 の条件下でマイナス電荷を持つアミノ酸が露出しており、プラス電荷を持っている  $\text{Fe}^{2+}$  イオンは静電相互作用によりチャネル 3 に取り込まれる。

## 【0 0 1 4】

アポフェリチン 1 の保持部 4 の内表面には、チャネル 3 の内表面と同じく、pH 7～8 でマイナス電荷を持つアミノ酸残基であるグルタミン酸残基が多く露出しており、チャネル 3 から取り込まれた  $\text{Fe}^{2+}$  イオンは *ferroxidase center* で酸化され、内部の保持部 4 へと導かれる。そして、静電相互作用により鉄イオンは濃縮されて、フェリハイドライト ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) 結晶の核形成が起こる。

## 【0 0 1 5】

その後、順次取り込まれる鉄イオンがこの結晶の核に付着して酸化鉄からなる核が成長し、直径 6 nm のナノ粒子が保持部 4 内に形成される。以上が、鉄イオンの取り込みと酸化鉄からなるナノ粒子形成の概略である。

## 【0 0 1 6】

なお、ここまで鉄イオンのアポフェリチンへの取り込みメカニズムについて述べたが、これまでに導入が報告されている他の金属イオンは、いずれもプラスイオンであることから、これらの金属イオンのアポフェリチンへの取り込みは、鉄イオンとほぼ同じメカニズムで進むと考えられる。

**【0017】****【発明が解決しようとする課題】**

しかしながら、これまでに上述の方法で、ニッケル（以下Niと記す）およびクロム（以下Crと記す）等の比較的酸化されにくい性質を有する金属を含む、直径が均一なナノ粒子を得ることは難しい。

**【0018】**

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであり、均一な直径を有するナノ粒子を得るための方法を提供することを目的とする。

**【0019】****【課題を解決するための手段】**

本発明のナノ粒子は、金属イオンの化合物からなるナノ粒子であって、炭酸イオンを含む溶液中において、タンパク質の空洞部内に形成されたものである。

**【0020】**

本発明によれば、直径がタンパク質の空洞部により規定されるので、直径が均一なナノ粒子が得られる。

**【0021】**

上記金属イオンは、Ni<sup>2+</sup>またはCr<sup>2+</sup>のいずれかである。

**【0022】**

本発明のナノ粒子の製造方法は、炭酸イオンを含む第1溶液と、金属イオンと、タンパク質と、pH緩衝剤とを含む第2溶液とを調製するステップ（a）と、上記第1溶液と上記第2溶液とを混合することによって、上記タンパク質に上記金属イオンの化合物からなるナノ粒子を内包させるステップ（b）とを含む。

**【0023】**

炭酸イオンを含む溶液中では、比較的酸化されにくい性質を有する金属イオンの化合物からなるナノ粒子であっても、タンパク質の空洞部内に形成される。タンパク質はDNA情報から作製され、公知の方法で多数複製することは容易である。また、同じDNAから多数複製されたタンパク質が、オングストロームの精度で同じ構造であることは周知である。このため、同じDNAから複製されたタンパク質が有する空洞部は、全て同じ形状である。従って、本発明によれば、直

径がタンパク質の空洞部により規定されるので、直径が均一なナノ粒子が得られる。

【0024】

上記タンパク質は、アポフェリチン、Dpsタンパク質、CCMVまたはTMVのうちのいずれか1つであってもよい。

【0025】

上記ステップ(a)では、上記第1溶液中に炭酸ガスを通気してもよい。

【0026】

上記金属イオンは、 $Ni^{2+}$ または $Cr^{2+}$ である。

【0027】

本発明のナノ粒子-タンパク質複合体は、ナノ粒子とタンパク質とから構成されるナノ粒子-タンパク質複合体であって、上記タンパク質は、上記ナノ粒子を保持可能な保持部と、上記保持部と上記タンパク質の外部とを結ぶチャンネルとを備え、上記ナノ粒子は、 $Ni^{2+}$ または $Cr^{2+}$ のいずれかの金属イオンの化合物から形成されている。

【0028】

炭酸イオンを含む溶液中では、比較的酸化されにくい性質を有する金属イオンの化合物からなるナノ粒子であっても、タンパク質の空洞部内に形成される。タンパク質はDNA情報から作製され、公知の方法で多数複製することは容易である。また、同じDNAから多数複製されたタンパク質が、オンゲストロームの精度で同じ構造であることは周知である。このため、同じDNAから複製されたタンパク質が有する空洞部は、全て同じ形状である。従って、本発明によれば、直径がタンパク質の空洞部により規定されるので、直径が均一なナノ粒子が得られる。このため、例えば本発明のナノ粒子-タンパク質複合体を基板上に配置し、タンパク質部分を除去する等の操作を行なうことにより、基板上にナノ粒子からなる微細なドット体を形成することができる。このドット体は、例えば不揮発性メモリのフローティングゲートに利用することができる。

【0029】

【発明の実施の形態】

以下、図1および図2を参照しながら本実施形態のナノ粒子の製造方法を説明する。

#### 【0030】

図2は、本実施形態のニッケル化合物のナノ粒子の製造方法を表すフローチャートである。

#### 【0031】

まず、図2に示すように、ステップS t 1では、HEPESとCAPSOとの混合溶液からなる緩衝液、アポフェリチン溶液、ニッケル塩溶液、ミリQ水、炭酸ガスを用意する。このとき、緩衝液、アポフェリチン溶液、ニッケル塩溶液およびミリQ水は、脱気したものを用意する。

#### 【0032】

次に、ステップS t 2では、脱気したミリQ水に炭酸ガスを通気（バブリング）することによって、二酸化炭素バブリング水を調製する。

#### 【0033】

次に、ステップS t 3では、上記ステップS t 2で得られた二酸化炭素バブリング水に、緩衝液、アポフェリチン溶液およびニッケル塩溶液を添加し、反応溶液を調製する。この後、反応溶液を24時間放置する。

#### 【0034】

なお、以上に説明したニッケルーアポフェリチン複合体を作製するための操作は、すべて室温、もしくはアポフェリチンが変性しない温度範囲にて、スターラーで攪拌しながら行なう。

#### 【0035】

上記の操作によって、アポフェリチン1の保持部4に水酸化ニッケル（Ni（OH）<sub>2</sub>）が導入され、Ni（OH）<sub>2</sub>のナノ粒子とアポフェリチンとの複合体（以下、ニッケルーアポフェリチン複合体と称する）が形成される。

#### 【0036】

アポフェリチンを含めて、タンパク質はDNA情報から作製され、公知の方法で多数複製することは容易である。また、同じDNAから多数複製されたタンパク質が、オングストロームの精度で同じ構造であることは周知である。このため

、本実施形態で用いるアポフェリチンが有する空洞状の保持部は、全て同じ形状である。

#### 【0037】

従って、本実施形態のように、タンパク質内にナノ粒子を作製すれば、ナノ粒子の直径がタンパク質により規定されるので、粒径が均一な半導体ナノ粒子が得られる。例えば、本実施形態では、ナノ粒子の直径は、アポフェリチンの保持部の直径とほぼ同じ 6 nm になる。

#### 【0038】

なお、本実施形態ではタンパク質としてアポフェリチンを用いたが、アポフェリチンの代わりに Dps タンパク質（直径 9 nm であり、内部に直径 4 nm の保持部を有する球殻状タンパク質）を用いれば、直径が 4 nm のナノ粒子を作製することができる。さらに、アポフェリチンの代わりに CCMV および TMV 等のウイルスタンパク質などを用いても、それぞれのタンパク質が有する内部の保持部の形状に応じたナノ粒子を作製することができる。

#### 【0039】

また、本実施形態では、Ni(OH)<sub>2</sub> からなるナノ粒子を作製する場合について説明したが、Cr(OH)<sub>2</sub> からなるナノ粒子を作製する場合にも、本実施形態とほぼ同じ方法を適用することができる。

#### 【0040】

なお、Cr(OH)<sub>2</sub> からなるナノ粒子を作製する場合、本実施形態で用いたニッケル塩溶液の代わりに、クロム塩溶液を反応溶液中に混合する。他の条件は、本実施形態に述べた通りである。

#### 【0041】

ここで、ニッケル-アポフェリチン複合体が形成されるメカニズムを説明する。このメカニズムを図 3 を参照しながら説明する。図 3 は、ニッケル-アポフェリチン複合体が形成されるメカニズムを説明するための模式図である。

#### 【0042】

本実施形態では、二酸化炭素バブリング水を用いて反応溶液を調製しているため、図 3 に示すように反応溶液中には炭酸水素イオンが存在する。一方、図 3 に

示すように、アポフェリチン 1 の保持部にはマイナスに帯電したアミノ酸残基が多数存在するので、反応溶液中の炭酸水素イオンは、アポフェリチン 1 の保持部 4 内に入ることが難しい。このため、アポフェリチン 1 の保持部 4 内の炭酸水素イオン濃度が、アポフェリチン 1 の外側の炭酸水素イオン濃度より低くなる。従って、アポフェリチン 1 の保持部 4 内の pH は、アポフェリチン 1 の外側の pH より高くなる。つまり、アポフェリチン 1 の保持部 4 内の水酸化物イオン ( $\text{OH}^-$ ) の濃度が高くなる。

#### 【0043】

さらに、アポフェリチン 1 の保持部にはマイナスに帯電したアミノ酸残基が多数存在するので、 $\text{Ni}^{2+}$  は多数存在する。 $\text{Ni}^{2+}$  の水酸化物の形成は pH が高くなると劇的に早くなり、不溶性の水酸化物を生じる。このため、アポフェリチン 1 の外側の  $\text{Ni}^{2+}$  の水酸化物の形成反応に比べて、アポフェリチン 1 の保持部 4 内の  $\text{Ni}^{2+}$  の水酸化物の形成反応が非常に早くなる。従って、アポフェリチン 1 の外側に生じる  $\text{Ni}^{2+}$  の水酸化物の沈殿にアポフェリチンが取り込まれる速度よりも、アポフェリチン 1 の保持部 4 内に  $\text{Ni}^{2+}$  の水酸化物のナノ粒子が形成される速度が非常に大きくなる。

#### 【0044】

このメカニズムは、 $\text{Ni}^{2+}$  に代えて  $\text{Cr}^{2+}$  とした場合にも適用することが可能であると考えられる。

#### 【0045】

また、ニッケル-アポフェリチン複合体が形成される別のメカニズムも考えられる。この別のメカニズムを、図 4 を参照しながら説明する。図 4 は、ニッケル-アポフェリチン複合体が形成されるメカニズムを説明するための図である。

#### 【0046】

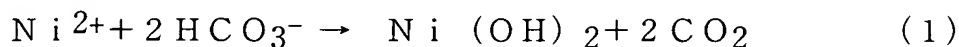
本実施形態では、二酸化炭素バブリング水を用いて反応溶液を調製しているため、図 4 に示すように反応溶液中には炭酸水素イオンが存在する。また、アポフェリチン 1 の保持部 4 内にも低濃度ではあるが炭酸水素イオンが存在する。

#### 【0047】

一方、図 4 に示すように、アポフェリチン 1 の保持部 4 にはマイナスに帯電し

たアミノ酸残基が多数存在するので、 $\text{Ni}^{2+}$ は多数存在する。 $\text{Ni}^{2+}$ と炭酸水素イオンは互いに逆に帯電しているので、反応する。このときの化学反応式は次の式1で表される。

【0048】



式1からわかるように、 $\text{Ni}(\text{OH})_2$ がアポフェリチン1の保持部4内で形成され、 $\text{CO}_2$ は反応溶液から自然に除去されていく。

【0049】

このメカニズムもまた、 $\text{Ni}^{2+}$ に代えて $\text{Cr}^{2+}$ とした場合にも適用することが可能であると考えられる。

【0050】

いずれにせよ、反応溶液中に炭素水素イオンが存在することが、本実施形態のナノ粒子の形成には重要である。従って、本実施形態のステップSt2では、脱気したミリQ水に炭酸ガスを通気（バブリング）しているが、これに限られず、炭酸水素イオン（ $\text{HCO}_3^-$ ）が反応溶液中に存在する方法を用いればよい。例えば、炭酸ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ）および炭酸水素ナトリウム（ $\text{NaHCO}_3$ ）等の炭酸塩を、ミリQ水に溶解して用いてもよい。

【0051】

なお、本実施形態では、緩衝液としてHEPESとCAPSOとの混合溶液を用いている。しかし、これに限定されず、pHを調節するための手段は何であってもよい。例えば、1種類の緩衝剤を含む緩衝液を用いてもよく、複数種の緩衝剤の混合溶液を緩衝液として用いてもよい。特に、複数種の緩衝剤の混合溶液を緩衝液として用いる方が、1種類の緩衝剤を含む緩衝液を用いるよりも、反応溶液のpHの調節が容易になる。従って、複数の緩衝剤の混合溶液を緩衝液として用いることが好ましい。

【0052】

ニッケル塩溶液は、本実施形態では硫酸ニッケルアンモニウム（ $\text{NiNH}_3(\text{SO}_4)$ ）を用いている。しかし、これに限定されない。例えば、硫酸ニッケル（ $\text{Ni}(\text{SO}_4)$ ）、硝酸ニッケル（ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ）、塩化ニッケル（ $\text{NiCl}_2$ ）等を用いてもよい。

12) を用いてもよい。

#### 【0053】

さらに、本実施形態では、ニッケル塩溶液を用いているが、クロム塩溶液を用いて、クロム-アポフェリチン複合体を形成することもできる。

#### 【0054】

なお、本実施形態に示したナノ粒子の製造方法について、より具体的な反応溶液の条件等は、実施例の欄で後述する。

#### 【0055】

(実施形態2)

本実施形態では、上記実施形態1において作製されたニッケル-アポフェリチン複合体を利用して形成されるドット体をフローティングゲートとして含む不揮発性メモリセルについて説明する。

#### 【0056】

図5(a)～図5(d)は、本実施形態の不揮発性メモリセルの製造方法を示す工程断面図である。

#### 【0057】

まず、図5(a)に示す工程で、p型Si基板101上に、LOCOS法により、活性領域を取り囲む素子分離酸化膜102を形成した後、基板上にトンネル絶縁膜として機能するゲート酸化膜103を熱酸化法によって形成する。その後、6nm程度の直径を有するニッケル化合物のナノ粒子からなるドット体104を基板上に形成する。なお、ドット体104を基板上に形成する方法については、後述する。

#### 【0058】

次に、図5(b)に示す工程で、基板上に、スパッタ法またはCVD法により、ドット体104を埋めるSiO<sub>2</sub>膜を堆積する。

#### 【0059】

次に、図5(c)に示す工程で、基板上にAl膜を堆積する。続いて、フォトリソマスクPr1を用いて、SiO<sub>2</sub>膜およびAl膜のパターニングを行なって電極間絶縁膜となるシリコン酸化膜105及び制御ゲート電極となるAl電



極 106 を形成する。このとき、ゲート酸化膜 103 のうちフォトレジストマスク Pr1 で覆われていない部分は除去されるので、その上のドット体 104 も同時に除去される。その後、フォトレジストマスク及び Al 電極 106 をマスクとして不純物イオンの注入を行なって、第 1、第 2 n 型拡散層 107 a、107 b を形成する。

#### 【0060】

その後、図 5 (d) に示す工程で、周知の方法により、層間絶縁膜 108 の形成と、層間絶縁膜 108 へのコンタクトホール 109 の開口と、コンタクトホール 109 内へのタングステンの埋め込みによるタングステンプラグ 110 の形成と、第 1、第 2 アルミニウム配線 111 a、111 b の形成とを行なう。

#### 【0061】

本実施形態では、基板として p 型 Si 基板を用いたが、n 型 Si 基板を用いてもよく、さらに、GaAs をはじめとする化合物半導体その他の半導体により構成される基板を用いてもよい。

#### 【0062】

次に、図 5 (a) に示す工程において、ドット体 104 を基板上に形成する方法を、図 6 および図 7 を参照しながら以下に説明する。なお、本発明は、以下に説明する方法には限定されず、他の公知の方法を適用することも可能である。

#### 【0063】

まず、図 6 (a) に示す工程で、上記実施形態 1 で得られたニッケル-アポフェリチン複合体（以下、本実施形態では複合体と略す）150 を用意し、この複合体 150 を基板 130 の表面上に配置する。このことによって、複合体 150 が基板 130 の表面上に高密度、且つ高精度で配置された複合体膜が形成される。なお、基板 130 とは、図 5 (a) に示す工程で、p 型 Si 基板 101 上に、LOCOS 法により、活性領域を取り囲む素子分離酸化膜 102 を形成した後、基板上にトンネル絶縁膜として機能するゲート酸化膜 103 が熱酸化法によって形成されたものを指す。以下の説明においても同様である。

#### 【0064】

次に、図 6 (b) に示す工程で、複合体 150 のうちのタンパク質分子 140

を除去して、 $\text{Ni}(\text{OH})_2$ のナノ粒子104aのみを残存させ、還元することによって、基板130上にニッケルのドット体104を形成する。

#### 【0065】

ここで、図6(a)に示す工程において、複合体150を基板130の表面上に高密度、且つ高精度で配置する、すなわち、基板130の表面上に2次元状に配列および固定する方法について説明する。本実施形態では、以下に、特開平1-45990号公報に記載の方法を図7を参照しながら説明する。

#### 【0066】

まず、図7(a)に示すように、複合体150を分散した液体160（本実施形態では、濃度4.0mM、pH5.3のリン酸バッファ溶液と、濃度4.0mMの塩化ナトリウム水溶液との等量混合溶液にニッケル-アポフェリチン複合体を分散したもの）を用意する。

#### 【0067】

続いて、図7(b)に示すように、PBLH(Poly-L-Benzyl-L-Histidine)を注射器などで静かに液体160の表面に展開する。このことによって、液体160の表面にPBLHからなるポリペプチド膜170が形成される。この後、液体160のpHを調節しておく。

#### 【0068】

次に、図7(c)に示すように、時間の経過に伴って複合体150がポリペプチド膜170に付着し、複合体150の2次元結晶ができる。これは、ポリペプチド膜170が正電荷を帯びているのに対し、複合体150は負電荷を帯びているからである。

#### 【0069】

次に、図7(d)に示すように、ポリペプチド膜170上に基板130を載置して（浮かべて）、ポリペプチド膜170を基板130に付着させる。

#### 【0070】

次に、図7(e)に示すように、基板130を取り出せば、ポリペプチド膜170を介して、複合体150の2次元結晶が付着した基板130を得ることができる。

**【0071】**

次に、図6（b）に示す工程をさらに詳細に説明する。

**【0072】**

タンパク質分子は一般に熱に弱いため、複合体150のうちのタンパク質分子140の除去は、熱処理によって行なう。例えば、窒素等の不活性ガス中において、400～500℃にて、約1時間静置すると、タンパク質分子140、および方法1の場合のポリペプチド膜170が焼失し、基板130上にはニッケルナノ粒子104aが2次元状に、高密度で、且つ高精度で規則正しく配列したドット体104として残存する。

**【0073】**

以上のようにして、図6（b）に示すように、複合体150に保持させたニッケルナノ粒子104aを、基板130上に2次元状に出現させ、高密度且つ高精度に配列したドット体104を形成することができる。

**【0074】**

図5（d）に示すように、本実施形態のメモリセル100は、制御ゲートとして機能するA1電極106と、ソースまたはドレインとして機能する第1、第2n型拡散層107a、107bとからなるMOSトランジスタ（メモリセルトランジスタ）を備え、フローティングゲートとして機能するドット体104に蓄えられた電荷の量で上記メモリトランジスタの閾値電圧が変化することを利用した不揮発性メモリセルである。

**【0075】**

この不揮発性メモリセルは、二値を記憶するメモリとしての機能が得られる。また、ニッケルおよびクロムは、表1に示すように、仕事関数が鉄やマンガン、コバルトなどと異なる。

**【0076】**

【表 1】

金属	仕事関数
Mn	4.08
Zn	4.33
Fe	4.60
Co	4.97
Ni	5.22
Pt	5.63

## 【0077】

このため、これらのナノ粒子を組み合わせる利用することによって、電子を蓄え易さの差を利用して電子の蓄積を制御することが可能となる。従って、量子効果デバイスの設計に融通性を持たせることができる。

## 【0078】

図8は、互いに仕事関数が異なる化合物から形成された複数種類のドット体104がフローティングゲートとして形成されている以外、上記不揮発性メモリセル100と全く同じ構成を有する不揮発性メモリセル100'の上面図である。

## 【0079】

図8に示すように、互いに仕事関数が異なる化合物から形成された複数種類のドット体104をフローティングゲートとして形成することによって、ドット体104に蓄えられる電荷の有無のみだけでなく電荷の蓄積量を制御することができる3値以上の多値メモリ（不揮発性メモリセル100'は4値メモリ）を実現することもできる。

## 【0080】

データの消去の際には、酸化膜を介したFN（Fowler-Nordheim）電流や直接トンネリング電流を利用する。

## 【0081】

また、データの書き込みの際には、酸化膜を介したFN電流や直接トンネリング電流あるいはチャネルホットエレクトロン（CHE）注入を用いる。

## 【0082】

本実施形態の不揮発性メモリセルでは、フローティングゲートが量子ドットとして機能できる程度に粒径の小さいニッケルナノ粒子により構成されているので、電荷の蓄積量がわずかである。したがって、書き込み、消去の際の電流量を小さくでき、低消費電力の不揮発性メモリセルを構成することができる。

#### 【0083】

また、本実施形態の不揮発性メモリセルでは、フローティングゲートを構成するニッケルのドット体104のサイズが均一であるため、電荷の注入、引き抜きの際の特性が各ニッケルのドット体104間で揃っており、これらの操作において制御が容易に行なえる。

#### 【0084】

##### 【実施例】

##### （実施例1）

本実施例では、まず、HEPES緩衝液、CAPSO緩衝液、市販のアポフェリチンを溶解したアポフェリチン溶液、および硫酸ニッケルアンモニウム溶液の各溶液を調製した。各溶液の濃度およびpHは、表2に示す通りである。なお、各溶液を調製した後、直ちにHEPES緩衝液およびCAPSO緩衝液の脱気を行った。

#### 【0085】

【表2】

溶液 (pH)	濃度
HEPES緩衝液 (pH7.5)	500mM
CAPSO緩衝液 (pH9.5)	500mM
アポフェリチン溶液	55mg/ml
硫酸ニッケルアンモニウム溶液	200mM

#### 【0086】

次に、ミリQ水を用意し、ミリQ水中に二酸化炭素を30分間通気（バブリング）することによって、二酸化炭素バブリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バブリング水に表2の各溶液を混合して、表3に示す組成の反応溶液を調製した。なお、ここでは3通りのCAPSO濃度を有する反応溶液を調製して

いる。このことによって、3種類のpHの反応溶液を調製した。

【0087】

【表3】

溶液 (pH)	濃度
HEPES緩衝液 (pH7.5)	150mM
CAPSO緩衝液 (pH9.5)	235、250、および265mM
アポフェリチン溶液	0.3mg/ml
硫酸ニッケルアンモニウム溶液	5mM

【0088】

また、表3に示す組成の各反応溶液を、総体積3mlとする場合、二酸化炭素バブリング水と表2の各溶液との添加量は、表4に示す通りである。

【0089】

【表4】

溶液 (濃度、pH)	添加量
二酸化炭素バブリング水	総体積が3mlとなるように添加
HEPES緩衝液(500mM、pH7.5)	900 $\mu$ l
CAPSO緩衝液(500mM、pH9.5)	1410、1500、および1590 $\mu$ l
アポフェリチン溶液(55mg/ml)	16.35 $\mu$ l
硫酸ニッケルアンモニウム溶液(200mM)	75 $\mu$ l

【0090】

以上のようにして得られた3種類のpHの各反応溶液を、23℃で24時間放置した。その後、各反応溶液を8000Gで30分間遠心し、それぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。

【0091】

次に、得られた各上清を水で3倍に薄め、2%金グルコースでアポフェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて5万倍の倍率で観察した。なお、2%金グルコースで染色した場合、アポフェリチン内の保持部に侵入することがないので、保持部が空洞であるアポフェリチンと、ニッケル-アポフェリチン複合体とを区別することができる。

## 【0092】

各上清を透過型電子顕微鏡で観察したところ、いずれもドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見えるニッケルのナノ粒子を内包したアポフェリチンが多数観察された。

## 【0093】

以上の観察結果を、CAPSO濃度とナノ粒子形成率との関係として表5に示す。なお、ナノ粒子形成率は、上清中のアポフェリチンのうち、 $\text{Ni}(\text{OH})_2$ のナノ粒子を内包したアポフェリチン（すなわち、ニッケル-アポフェリチン複合体）の割合である。

## 【0094】

【表5】

CAPSO濃度	235mM	250mM	265mM
pH	8.2	8.3	8.4
ナノ粒子形成率	90%	100%	100%

## 【0095】

一方、上記二酸化炭素バブリング水の代わりに、窒素バブリング水および酸素バブリング水を用い、他の条件は全く同様にした場合の結果をそれぞれ表6および表7に示す。表6は、窒素バブリング水を用いた場合の結果、表7は酸素バブリング水を用いた結果を示す。

## 【0096】

【表6】

CAPSO濃度	235mM	250mM	265mM
pH	8.2	8.3	8.4
ナノ粒子形成率	0%	5%	20%

## 【0097】

【表7】

CAPSO濃度	235mM	250mM	265mM
pH	8.1	8.2	8.3
ナノ粒子形成率	0%	5%	20%

## 【0098】

これらの上清の状態を観察したところ、CAPSO濃度が250 mMである反応溶液の上清は濁っており、CAPSO濃度が265 mMである反応溶液の上清ではNi(OH)<sub>2</sub>の沈殿が多数見られた。従って、pH 8.3付近が、本実施例の反応溶液の組成でのNi(OH)<sub>2</sub>の沈殿点と考えられる。

## 【0099】

表5～7の結果から、アポフェリチンを含む溶液において、沈殿点付近のpHになるとNi<sup>2+</sup>はNi(OH)<sub>2</sub>として析出し、アポフェリチン内の保持部にナノ粒子を形成することができると考えられる。しかし実際には、アポフェリチンの沈殿凝集を生じさせることなくNi(OH)<sub>2</sub>のナノ粒子を形成することは極めて困難である。

## 【0100】

本実施例では、二酸化炭素バブリング水、窒素バブリング水および酸素バブリング水のいずれを用いた場合においても、沈殿点付近のpHであるCAPSO濃度が265 mMの反応溶液の上清では、アポフェリチンが凝集沈殿していた。このため、ニッケル-アポフェリチン複合体を回収することが困難であり、工業的に利用するのは現実的ではないと考えられる。

## 【0101】

但し、表5～7に示すように、CAPSO濃度が265 mMである反応溶液の上清では、二酸化炭素バブリング水を用いた場合のみ、ほぼ100%のアポフェリチンの保持部にNi(OH)<sub>2</sub>のナノ粒子が形成されていた。

## 【0102】

さらに、二酸化炭素バブリング水を用いた場合、沈殿点よりもわずかに低いpH (CAPSO濃度が235 mM、および250 mMである反応溶液の上清) でも、大半のアポフェリチンの保持部にNi(OH)<sub>2</sub>のナノ粒子が形成されており、アポフェリチンの凝集沈殿も抑制されていた。

## 【0103】

それに対して、窒素バブリング水および酸素バブリング水を用いた場合では、沈殿点よりもわずかに低いpH (CAPSO濃度が235 mM、および250 m



Mである反応溶液の上清)で、大半のアポフェリチンの保持部にNi(OH)<sub>2</sub>のナノ粒子が形成されていなかった。

#### 【0104】

つまり、アポフェリチンの凝集を抑えながら、アポフェリチンの保持部にNi(OH)<sub>2</sub>のナノ粒子を形成することができるのは二酸化炭素バブリング水を用いた場合のみであった。

#### 【0105】

##### (実施例2)

本実施例では、まず、HEPES緩衝液、CAPSO緩衝液、市販のアポフェリチンを溶解したアポフェリチン溶液、およびニッケル塩溶液(硫酸ニッケル溶液、硝酸ニッケル溶液および塩化ニッケル溶液)の各溶液を調製した。各溶液の濃度およびpHは、表8に示す通りである。なお、各溶液を調製した後、直ちにHEPES緩衝液およびCAPSO緩衝液の脱気を行った。

#### 【0106】

【表8】

溶液 (pH)	濃度
HEPES緩衝液 (pH7.5)	500mM
CAPSO緩衝液 (pH9.5)	500mM
アポフェリチン溶液	55mg/ml
ニッケル塩溶液	200mM

#### 【0107】

次に、ミリQ水を用意し、ミリQ水中に二酸化炭素を30分間通気(バブリング)することによって、二酸化炭素バブリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バブリング水に表8の各溶液を混合して、表9に示す組成の反応溶液を調製した。なお、ここでは3通りのCAPSO濃度を有する反応溶液を調製している。このことによって、3種類のpHの反応溶液を調製した。

#### 【0108】

【表 9】

溶液 (pH)	濃度
HEPES緩衝液 (pH 7.5)	150 mM
CAPS緩衝液 (pH 9.5)	140、150、および160 mM
アポフェリチン溶液	0.3 mg/ml
ニッケル塩溶液	5 mM

## 【0109】

また、表 9 に示す組成の各反応溶液を、総体積 3 ml とする場合、二酸化炭素バブリング水と表 8 の各溶液との添加量は、表 10 に示す通りである。

## 【0110】

【表 10】

溶液 (濃度、pH)	添加量
二酸化炭素バブリング水	総体積が 3 ml となるように添加
HEPES緩衝液(500 mM、pH 7.5)	900 $\mu$ l
CAPS緩衝液(500 mM、pH 9.5)	840、900、および960 $\mu$ l
アポフェリチン溶液(55 mg/ml)	16.35 $\mu$ l
硫酸ニッケルアンモニウム溶液(200 mM)	75 $\mu$ l

## 【0111】

以上のようにして得られた 3 種類の pH の各反応溶液を、23℃で 24 時間放置した。その後、各反応溶液を 8000 G で 30 分間遠心し、それぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。CAPS 濃度が 160 mM である反応溶液の各上清 (pH 8.24) は、わずかに濁っており、pH 8.2 付近が本実施例の反応溶液の組成での  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  の沈殿点であると考えられた。

## 【0112】

次に、得られた各上清を水で 3 倍に薄め、2% 金グルコースでアポフェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて 5 万倍の倍率で観察した。なお、2% 金グルコースで染色した場合、アポフェリチン内の保持部に侵入することがないので、保持部が空洞であるアポフェリチンと、ニッケル-アポフェリチン複合体とを区別することができる。

## 【0113】

各上清を透過型電子顕微鏡で観察した結果を図9 (a) ~ (c) に示す。図9 (a) ~ (c) に示すように、いずれもドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見える  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  のナノ粒子を内包したアポフェリチンが観察された。

#### 【0114】

以上の観察結果を、CAPSO濃度と使用するニッケル塩毎のナノ粒子形成率との関係として表11に示す。なお、ナノ粒子形成率は、上清中のアポフェリチンのうち、 $\text{Ni}(\text{OH})_2$  のナノ粒子を内包したアポフェリチン（すなわち、ニッケル-アポフェリチン複合体）の割合である。

#### 【0115】

【表11】

CAPSO濃度	ナノ粒子形成率 (%)		
	硫酸ニッケル	硝酸ニッケル	塩化ニッケル
140mM (pH8.14)	40-50	30-40	50-60
160mM (pH8.19)	100	100	100
180mM (pH8.24)	100	100	100

#### 【0116】

表11からわかるように、本実施例の反応溶液の組成での  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  の沈殿点である pH8.2 付近で、ほぼ100%のアポフェリチンの保持部に  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  のナノ粒子が形成された。また、CAPSO濃度が160mMである反応溶液の各上清 (pH8.14) においても、ナノ粒子形成率が低下しているものの、アポフェリチンの保持部に  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  のナノ粒子が形成されることがわかる。

#### 【0117】

本実施例の結果と、上記実施例1の結果とから、 $\text{Ni}(\text{OH})_2$  の沈殿点よりもわずかに低い pHが、アポフェリチンの保持部に  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  のナノ粒子が形成するために適していると考えられる。

#### 【0118】

さらに、本実施例の結果から、ナノ粒子形成率は、ニッケル塩の陰イオンの種

類によらずほぼ同じであり、ナノ粒子形成にニッケル塩の陰イオンが影響しないことがわかる。

### 【0119】

#### (実施例3)

本実施例では、まず、HEPES緩衝液、CAPSO緩衝液、市販のアポフェリチンを溶解したアポフェリチン溶液、アンモニア水、および硫酸ニッケルアンモニウム溶液の各溶液を調製した。各溶液の濃度およびpHは、表12に示す通りである。なお、各溶液を調製した後、直ちにHEPES緩衝液およびCAPSO緩衝液の脱気を行った。

### 【0120】

【表12】

溶液 (pH)	濃度
HEPES緩衝液 (pH7.5)	500mM
CAPSO緩衝液 (pH9.5)	500mM
アポフェリチン溶液	55mg/ml
アンモニア水	1000mM
硫酸ニッケルアンモニウム溶液	200mM

### 【0121】

次に、ミリQ水を用意し、ミリQ水中に二酸化炭素を30分間通気（バブリング）することによって、二酸化炭素バブリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バブリング水に表12の各溶液を混合して、反応溶液を調製した。また、同時に二酸化炭素を通気せず、脱気しただけの水（脱気水）を、二酸化炭素バブリング水の代わりに加えた反応溶液も調製した。それぞれの反応溶液の組成を表13に示す。

### 【0122】

【表 13】

溶液 (pH)	濃度
HEPES緩衝液 (pH 7.5)	150 mM
CAPSO緩衝液 (pH 9.5)	210 mM
アポフェリチン溶液	0.3 mg/ml
アンモニア水	20 mM
硫酸ニッケルアンモニウム溶液	5 mM

## 【0123】

また、表 13 に示す組成の反応溶液を、総体積 3 ml とする場合、表 12 の各溶液と二酸化炭素バブリング水または脱気水との添加量は、表 14 に示す通りである。

## 【0124】

【表 14】

溶液 (濃度、pH)	添加量
二酸化炭素バブリング水または脱気水	総体積が 3 ml となるように添加
HEPES緩衝液(500 mM、pH 7.5)	900 $\mu$ l
CAPSO緩衝液(500 mM、pH 9.5)	1260 $\mu$ l
アポフェリチン溶液(55 mg/ml)	16.35 $\mu$ l
アンモニア水	60 $\mu$ l
硫酸ニッケルアンモニウム溶液(200 mM)	75 $\mu$ l

## 【0125】

以上のようにして得られた各反応溶液を、23℃で24時間放置した。その後、各反応溶液を8000 Gで30分間遠心し、それぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。

## 【0126】

次に、得られた各上清を水で3倍に薄め、2%金グルコースでアポフェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて5万倍の倍率で観察した。なお、2%金グルコースで染色した場合、アポフェリチン内の保持部に侵入することがないので、保持部が空洞であるアポフェリチンと、ニッケル-アポフェリチン複合体とを区別することができる。

## 【0127】

二酸化炭素バブリング水を用いた反応溶液の上清を透過型電子顕微鏡で観察した結果を図10(a)に示す。図10(a)に示すように、ドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見えるNi(OH)<sub>2</sub>のナノ粒子を内包したアポフェリチンが観察された。

## 【0128】

二酸化炭素バブリング水を用いた反応溶液の上清のpHをさらに調節し、沈殿点を探索した結果、Ni(OH)<sub>2</sub>の沈殿点のpH 8.65であった。上記実施例1および2に比べて沈殿点のpHが上昇した理由は、アンモニウムイオンがNi<sup>2+</sup>と錯体を形成し、Ni<sup>2+</sup>を保護するためだと考えられる。この沈殿点のpH 8.65からやや低いpH範囲がNi(OH)<sub>2</sub>のナノ粒子を形成する最適なpH範囲である。二酸化炭素バブリング水を用いた反応溶液の上清が、上記最適なpH範囲にあるとき、アポフェリチンの凝集は抑えられており、アポフェリチンの保持部にNi(OH)<sub>2</sub>のナノ粒子が形成されていることを確認できた。

## 【0129】

二酸化炭素バブリング水を用いた反応溶液の上清のpHが沈殿点のpH 8.65よりも上昇すると、アポフェリチンが凝集し、工業的に利用することが困難になる。また、二酸化炭素バブリング水を用いた反応溶液の上清のpHがナノ粒子を形成する最適なpH範囲よりも低くなるにつれて、ナノ粒子の形成は減少し、pH 8.3ではナノ粒子の形成を確認できなかった。

## 【0130】

一方、脱気水を用いた反応溶液の上清を透過型電子顕微鏡で観察した結果を図10(b)に示す。図10(b)に示すように、ドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見えるNi(OH)<sub>2</sub>のナノ粒子を内包したアポフェリチンが観察されなかった。また、脱気水を用いた反応溶液の上清のpHを様々に変化させても結果は同じであった。ナノ粒子の形成されない原因は、アンモニウムイオンの影響であると考えられるが、そのメカニズムは不明である。

## 【0131】

いずれにせよ、本実施例では、反応溶液中に存在するアンモニウムイオンがN

$i^{2+}$ と錯体を形成することによって安定化するため、 $Ni(OH)_2$ の沈殿点の pH が高くなっている。しかしながら、反応溶液中に炭酸イオンが存在することがナノ粒子の形成のために重要であることと、反応溶液の pH を  $Ni(OH)_2$  の沈殿点の pH よりもわずかに低い pH に保つことがナノ粒子の形成に適していることは、上記実施例 1 および 2 と共通している。

#### 【0132】

##### (実施例 4)

本実施例では、まず、HEPES 緩衝液、MES 緩衝液、遺伝子工学的に作製した L 鎖のみのアポフェリチンを溶解した L 鎖アポフェリチン溶液、および硫酸クロムアンモニウム溶液の各溶液を調製した。各溶液の濃度および pH は、表 15 に示す通りである。なお、各溶液を調製した後、直ちに HEPES 緩衝液および MES 緩衝液の脱気を行った。

#### 【0133】

【表 15】

溶液 (pH)	濃度
HEPES 緩衝液 (pH 7.5)	500 mM
MES 緩衝液 (pH 5.5)	55 mM
L 鎖アポフェリチン溶液	27.5 mg/ml
硫酸クロムアンモニウム溶液	200 mM

#### 【0134】

次に、ミリ Q 水を用意し、ミリ Q 水中に二酸化炭素を 30 分間通気（バブリング）することによって、二酸化炭素バブリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バブリング水に表 1 の各溶液を混合して、表 16 に示す組成の反応溶液を調製した。

#### 【0135】

【表 16】

溶液 (pH)	濃度
HEPES 緩衝液 (pH 7.5)	150 mM
MES 緩衝液 (pH 5.5)	210 mM
L鎖アポフェリチン溶液	0.1 mg/ml
硫酸クロムアンモニウム溶液	5 mM

## 【0136】

また、表 16 に示す組成の各反応溶液を、総体積 3 ml とする場合、二酸化炭素バブリング水と表 15 の各溶液との添加量は、表 17 に示す通りである。

## 【0137】

【表 17】

溶液 (濃度、pH)	添加量
二酸化炭素バブリング水	総体積が 3 ml となるように添加
HEPES 緩衝液 (500 mM、pH 7.5)	900 $\mu$ l
MES 緩衝液 (500 mM、pH 5.5)	1260 $\mu$ l
L鎖アポフェリチン溶液 (27.5 mg/ml)	16.35 $\mu$ l
硫酸クロムアンモニウム溶液 (200 mM)	75 $\mu$ l

## 【0138】

以上のようにして得られた反応溶液を、23℃で24時間放置した。その後、各反応溶液を8000Gで30分間遠心し、それぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。

## 【0139】

次に、得られた各上清を水で3倍に薄め、2%金グルコースでアポフェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて5万倍の倍率で観察した。なお、2%金グルコースで染色した場合、アポフェリチン内の保持部に侵入することがないので、保持部が空洞であるアポフェリチンと、Cr(OH)<sub>2</sub>のナノ粒子を内包したアポフェリチン (すなわち、クロム-アポフェリチン複合体) とを区別することができる。

## 【0140】

各上清を透過型電子顕微鏡で観察したところ、いずれもドーナツ状にタンパク



質部分が白く、中心部が黒く見える  $\text{Cr}(\text{OH})_2$  のナノ粒子を内包したアポフェリチンが多数観察された。

#### 【0141】

反応溶液を  $\text{Cr}(\text{OH})_2$  の沈殿点付近の pH としているため、反応溶液の上清はわずかに濁っていた。上清を透過型電子顕微鏡で観察したところ、ドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見える  $\text{Cr}(\text{OH})_2$  のナノ粒子を内包したアポフェリチンが観察された。

#### 【0142】

本実施例の条件では、約 50% のアポフェリチン内に  $\text{Cr}(\text{OH})_2$  のナノ粒子を確認した。二酸化炭素バブリング水のかわりに、脱気水を用いたこと以外同じ条件の反応溶液で  $\text{Cr}(\text{OH})_2$  のナノ粒子の形成を試みたが、 $\text{Cr}(\text{OH})_2$  のナノ粒子の形成を確認することはできなかった。

#### 【0143】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、均一な直径を有するナノ粒子を得ることができる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、アポフェリチンの構造を示す模式図である。

##### 【図2】

図2は、実施形態1のニッケルーアポフェリチン複合体の作製方法を表すフローチャートである。

##### 【図3】

図3は、ニッケルーアポフェリチン複合体が形成されるメカニズムを説明するための模式図である。

##### 【図4】

図4は、ニッケルーアポフェリチン複合体が形成されるメカニズムを説明するための模式図である。

##### 【図5】

図5(a)～図5(d)は、不揮発性メモリセルの製造方法を示す工程断面図

である。

【図 6】

図 6 は、ドット体を基板の表面上に 2 次元状に配列および固定する方法を示す工程断面図である。

【図 7】

図 7 は、複合体を基板の表面上に 2 次元状に配列および固定する方法について説明する図である。

【図 8】

図 8 は、不揮発性メモリセルの上面図である。

【図 9】

図 9 (a) ~ (c) は、ナノ粒子の形成状態を表す電子顕微鏡写真である。

【図 10】

図 10 は、ナノ粒子の形成状態を表す電子顕微鏡写真である。

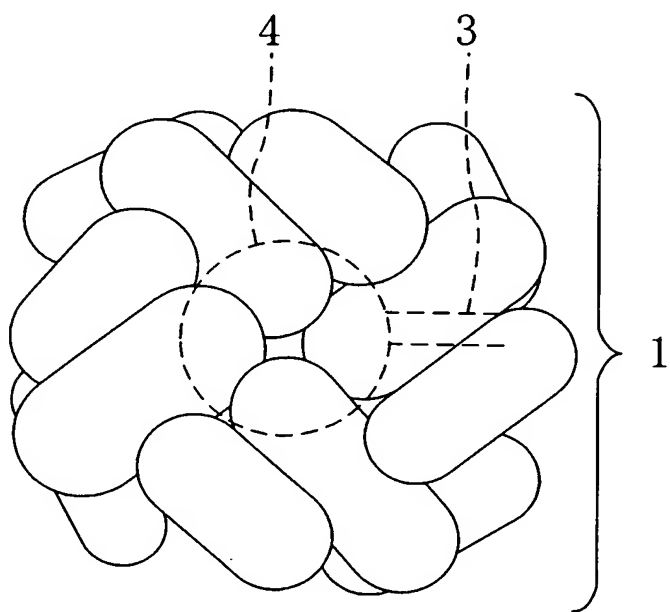
【符号の説明】

- 1 アポフェリチン
- 3 チャネル
- 4 保持部
- 100、100' メモリセル
- 101 p 型 Si 基板
- 102 素子分離酸化膜
- 103 ゲート酸化膜
- 104 ドット体
- 104a ナノ粒子
- 105 シリコン酸化膜
- 106 Al 電極
- 107a 第 1 n 型拡散層
- 107b 第 2 n 型拡散層
- 108 層間絶縁膜
- 109 コンタクトホール

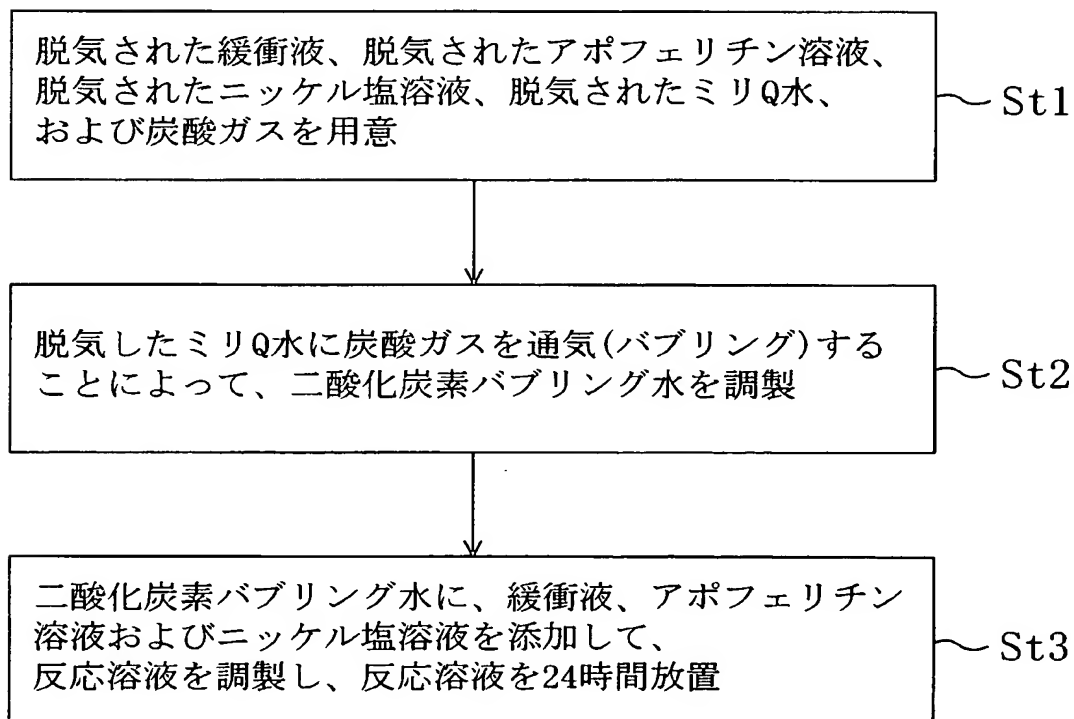
- 1 1 0 タングステンプラグ
- 1 1 1 a 第 1 アルミニウム配線
- 1 1 1 b 第 2 アルミニウム配線
- 1 3 0 基板
- 1 4 0 タンパク質分子
- 1 5 0 ニッケル-アポフェリチン複合体
- 1 6 0 液体
- 1 7 0 ポリペプチド膜

【書類名】 図面

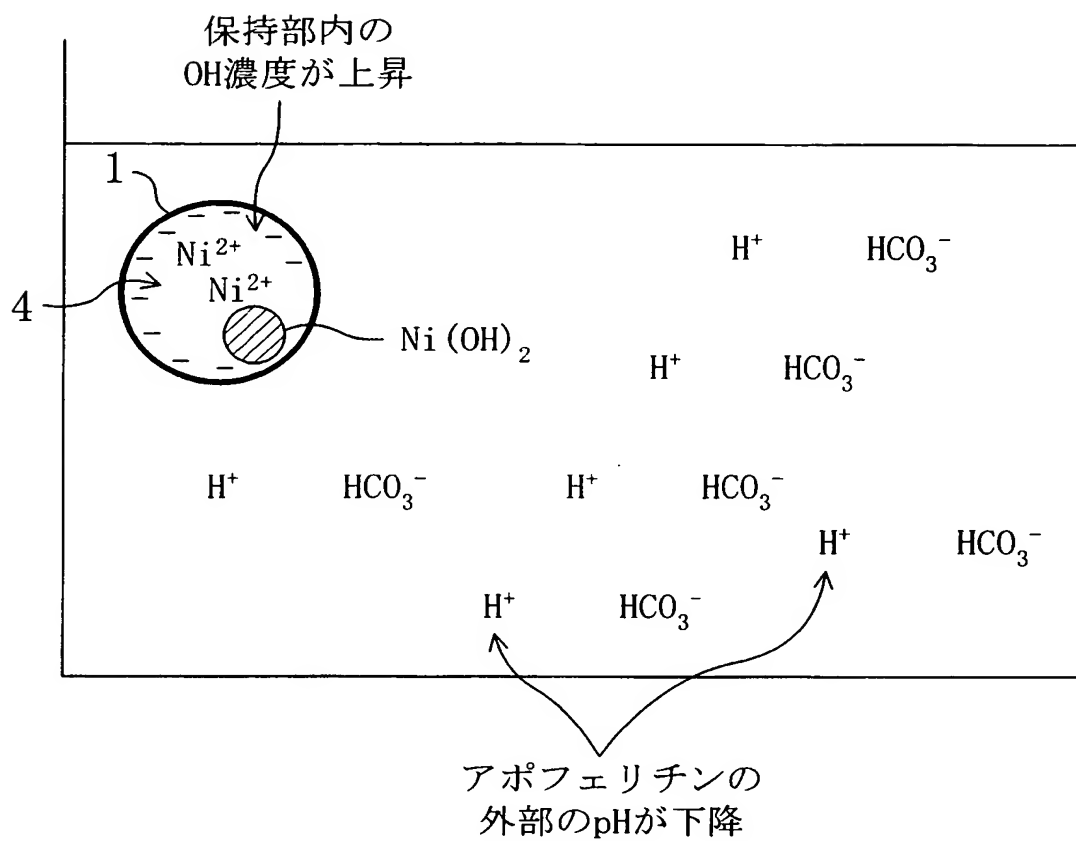
【図1】



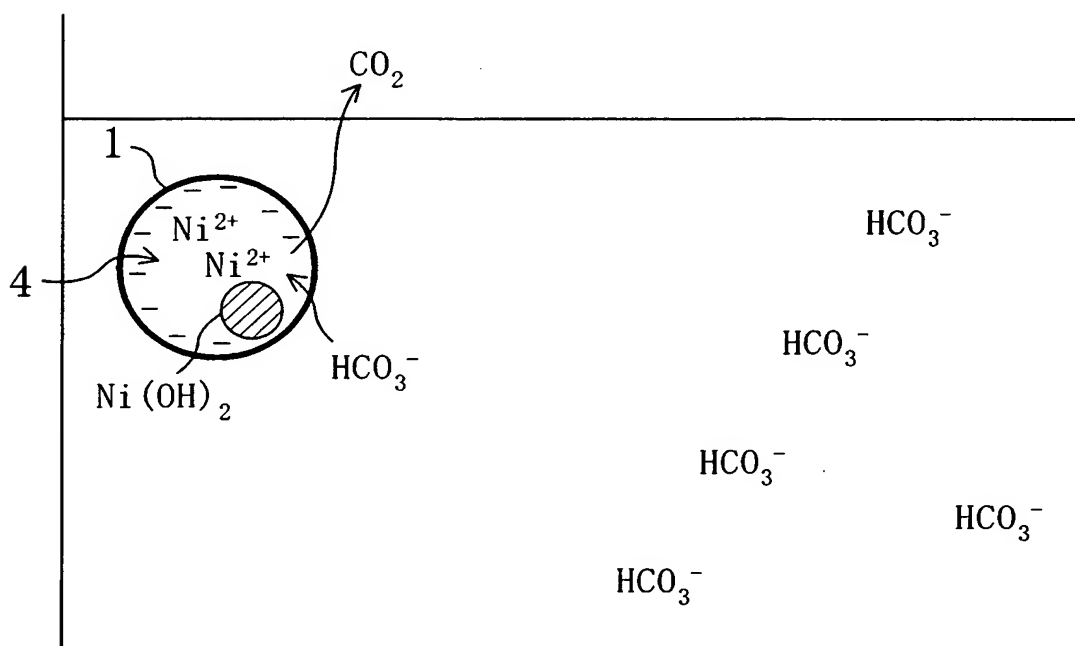
【図2】



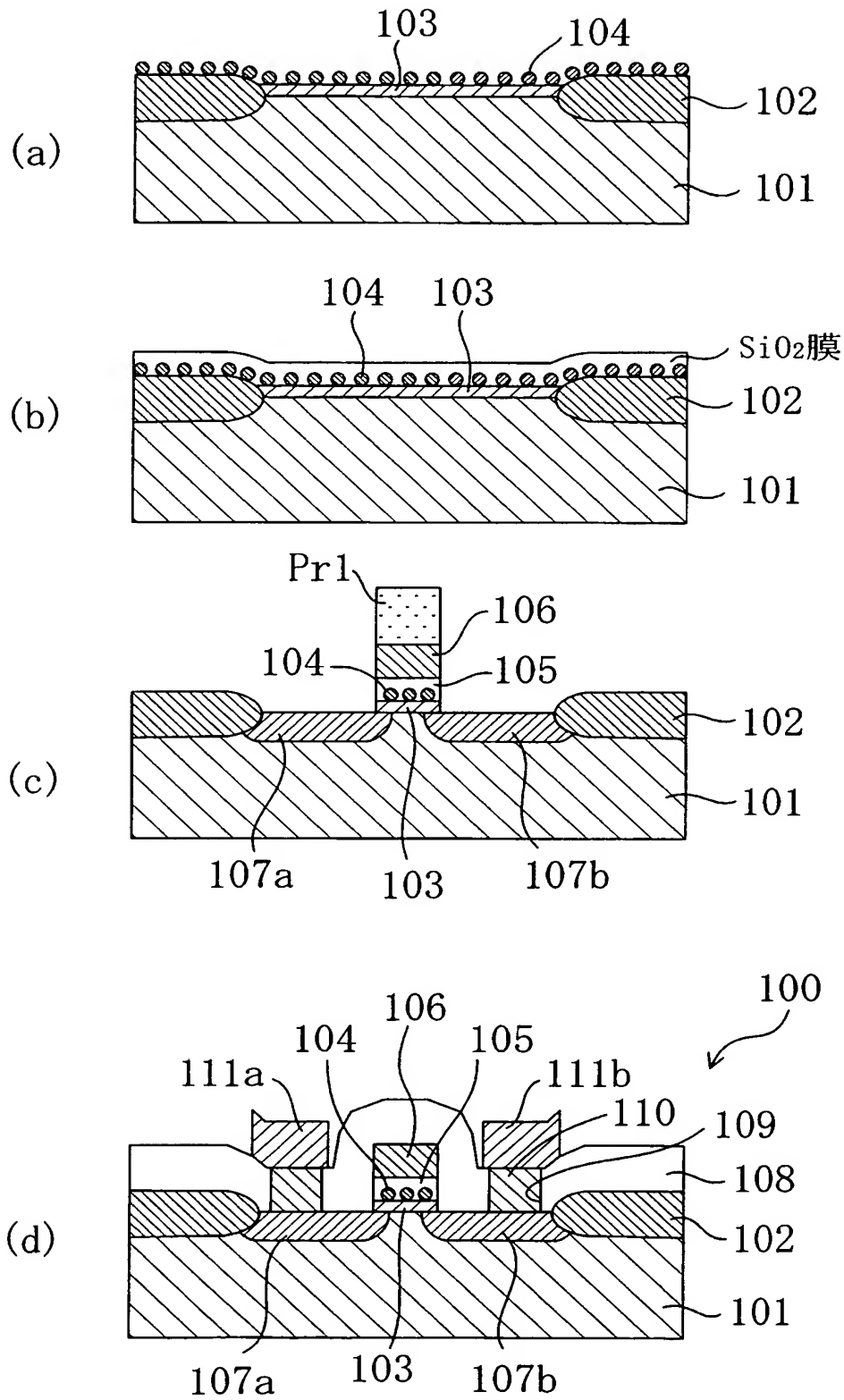
【図 3】



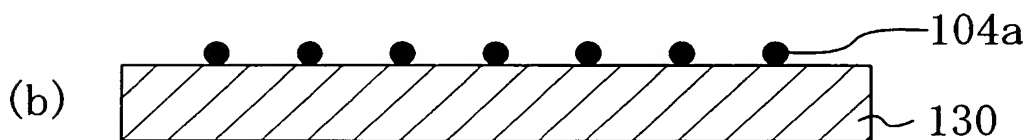
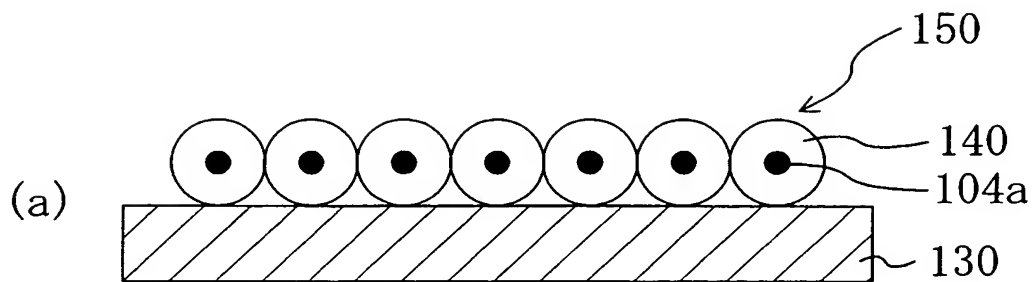
【図 4】



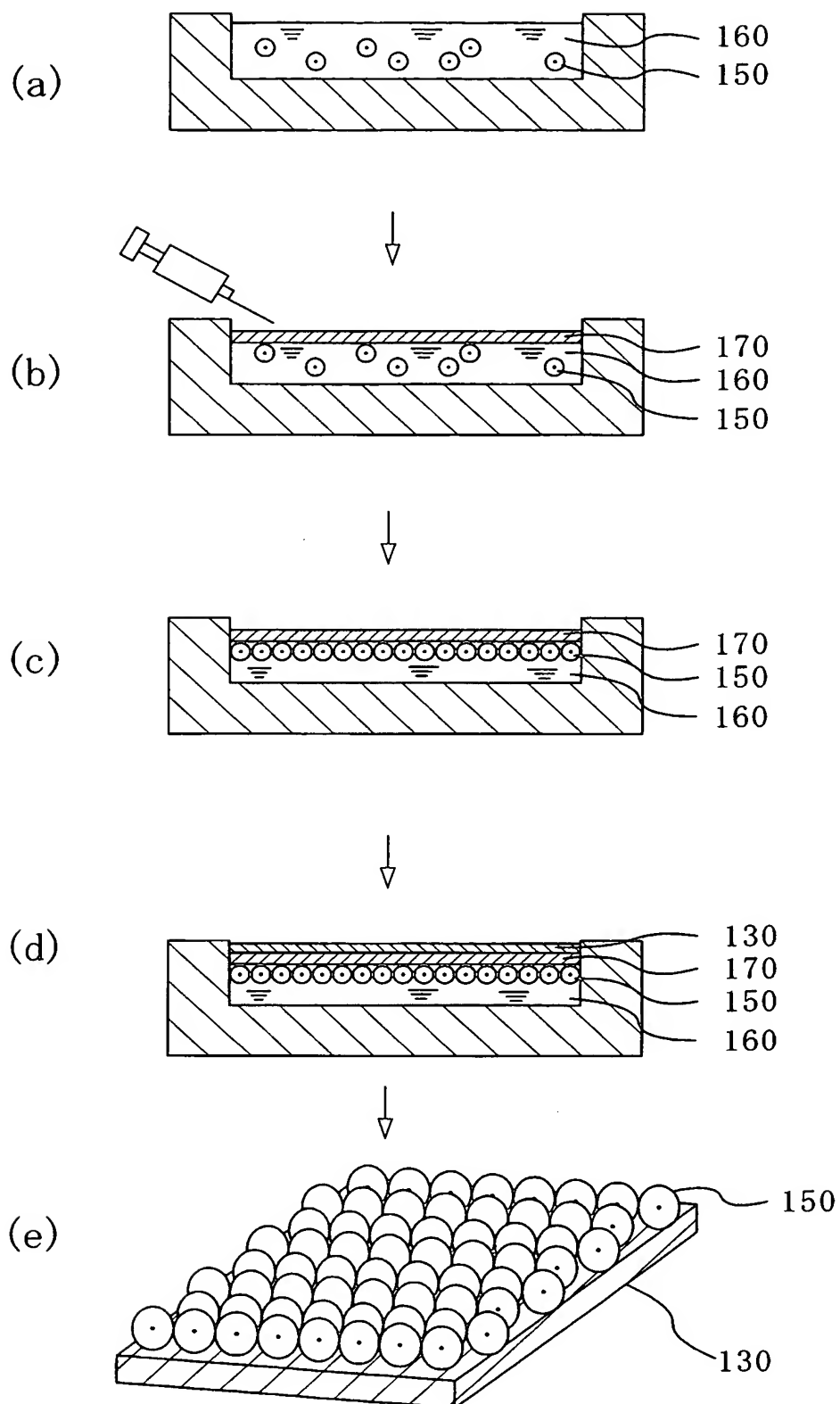
【図5】



【図 6】

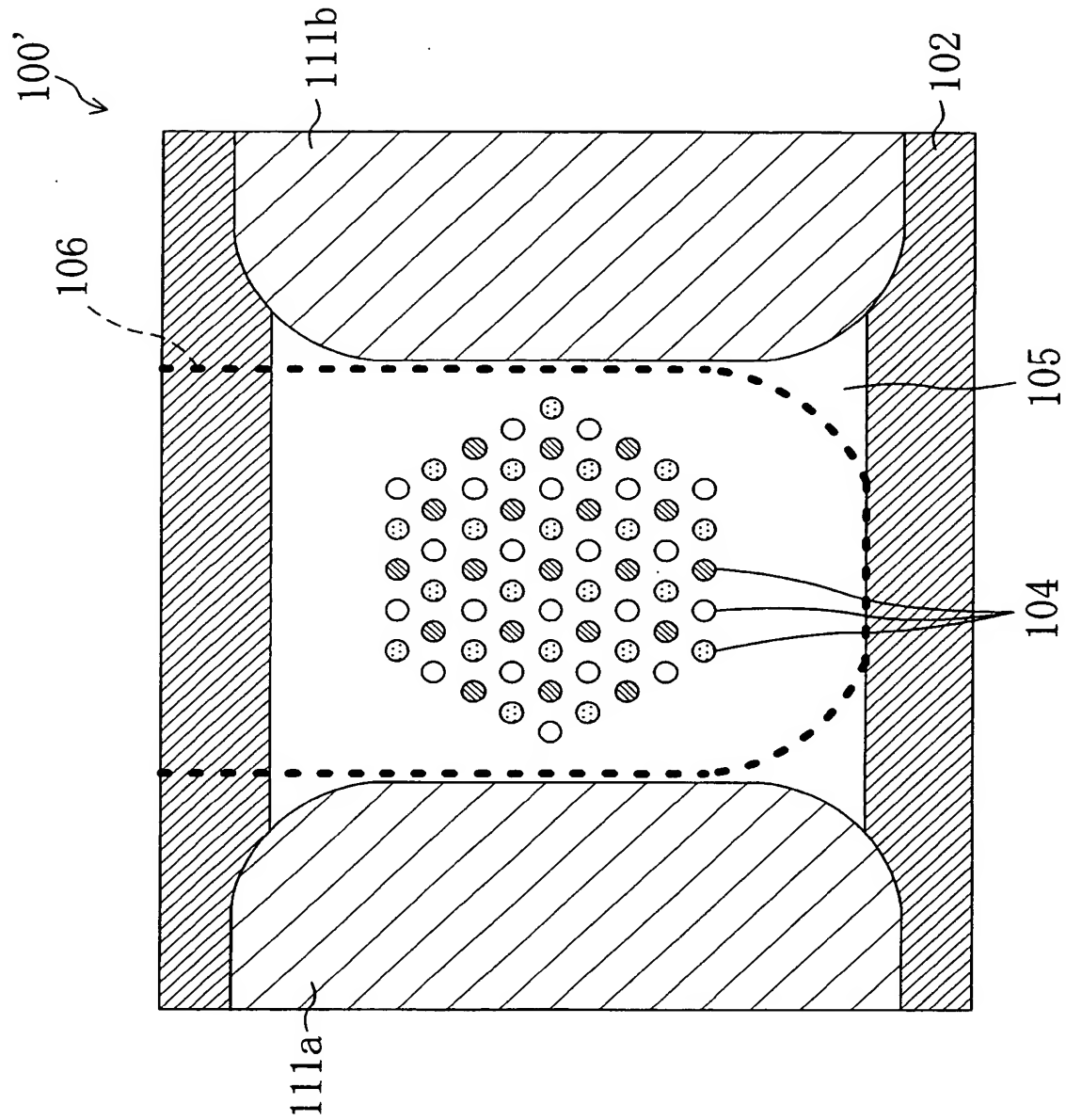


【図 7】



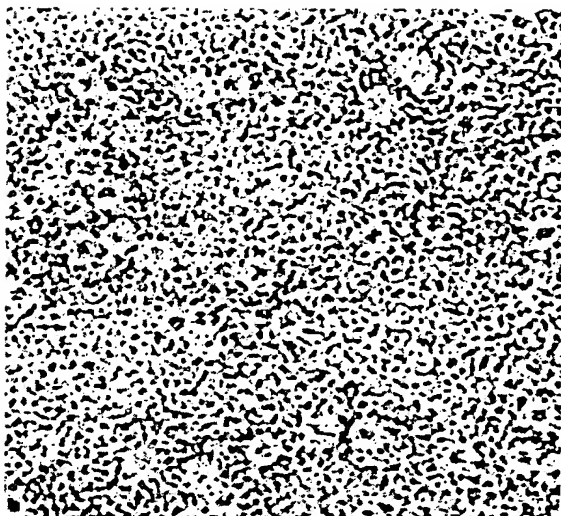


【図 8】

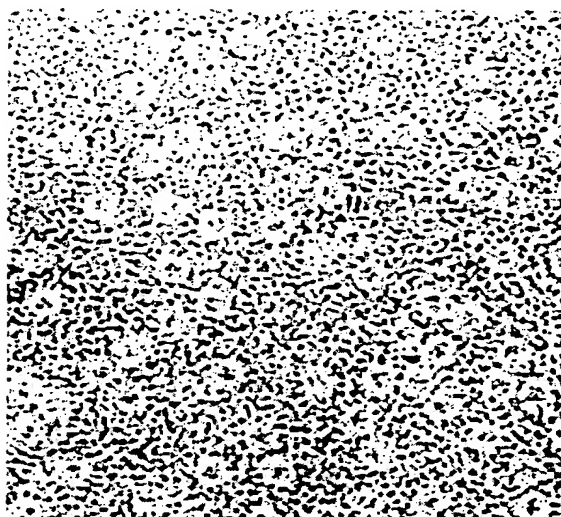


【図 9】

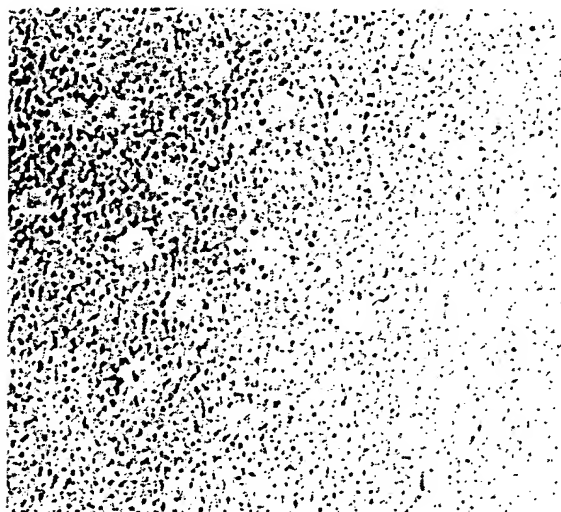
(a)



(b)

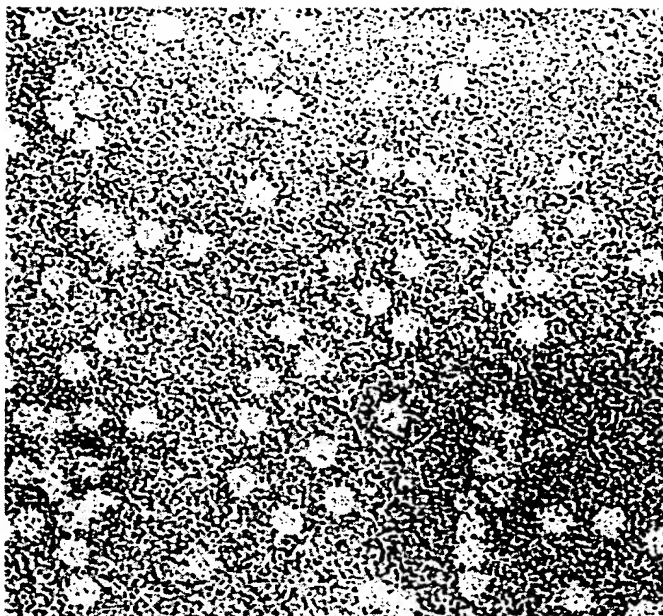


(c)

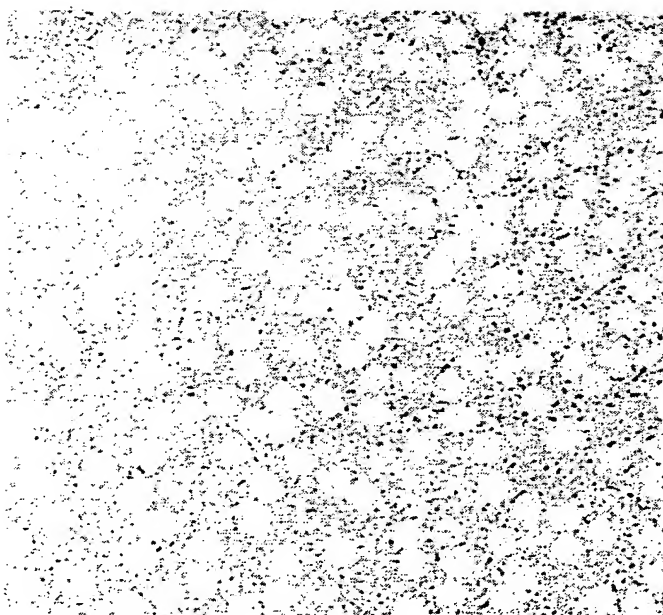


【図 10】

(a)



(b)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 均一な粒径を有するナノ粒子が形成されたナノ粒子を得るための方法を提供する。

【解決手段】 まず、図2に示すように、ステップS t 1では、H E P E SとC A P S Oとの混合溶液からなる緩衝液、アポフェリチン溶液、ニッケル塩溶液、ミリQ水、炭酸ガスを用意する。このとき、緩衝液、アポフェリチン溶液、ニッケル塩溶液およびミリQ水は、脱気したものを用意する。次に、ステップS t 2では、脱気したミリQ水に炭酸ガスを通気（バブリング）することによって、二酸化炭素バブリング水を調製する。次に、ステップS t 3では、上記ステップS t 2で得られた二酸化炭素バブリング水に、緩衝液、アポフェリチン溶液およびニッケル塩溶液を添加し、反応溶液を調製する。この後、反応溶液を24時間放置する。

【選択図】 図2

特願 2 0 0 2 - 2 7 5 5 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 5 8 2 1 ]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

氏 名

松下電器産業株式会社